

# PATENT ABSTRACTS OF JAPAN

(11)Publication number : 06-261767

(43)Date of publication of application : 20.09.1994

1)Int.Cl.

C12N 15/54  
A01H 5/00  
C12N 5/10  
C12P 19/16  
// A23L 1/10  
C12N 9/10

1)Application number : 05-265171

(71)Applicant : MITSUI GIYOUUSAI SHOKUBUTSU BIO  
KENKYUSHO:KK

2)Date of filing : 22.10.1993

(72)Inventor : BABA TADASHI  
SHIMADA HIROAKI

3)Priority

Priority number : 04291719 Priority date : 29.10.1992 Priority country : JP

## 1) NEW RICE PLANT STARCH-BRANCHED ENZYMIC GENE

2)Abstract:

PROPOSE: To carry out the production increase of a food, production of rice excellent in taste and breeding a plant, especially rice plant by isolating a gene of a new starch-branched enzyme having an important influence on the synthesis of amylopectin.

INSTITUTION: A DNA sequence in which all or a part of a gene of a new rice starch-branched enzyme is joined to a promoter of the gene or a promoter expressible in a plant cell in the forward or reverse direction is introduced into a plant such as rice plant to express the gene of the starch-branched enzyme or an antisense RNA. Thereby, the content of amylose or amylopectin which is starch in grains can be changed.

## 3)AL STATUS

Date of request for examination] 14.06.2000

BEST AVAILABLE COPY

Date of sending the examiner's decision of rejection]

Date of final disposal of application other than the

examiner's decision of rejection or application

Inverted registration]

Date of final disposal for application]

arching PAJ

atent number]

3513192

ate of registration]

16.01.2004

umber of appeal against examiner's decision of  
ection]

ate of requesting appeal against examiner's  
cision of rejection]

ate of extinction of right]

Copyright (C); 1998,2003 Japan Patent Office

(19)日本国特許庁 (JP)

(12) 公開特許公報 (A)

(11)特許出願公開番号

特開平6-261767

(43)公開日 平成6年(1994)9月20日

(51)Int.Cl. <sup>5</sup>	識別記号	庁内整理番号	F I	技術表示箇所
C 12 N 15/54	Z NA			
A 01 H 5/00	Z NA A	8502-2B		
C 12 N 5/10				
	9050-4B	C 12 N 15/00	A	
	8412-4B	5/00	C	
		審査請求 未請求 請求項の数11 O L (全13頁) 最終頁に続く		

(21)出願番号 (22)出願日 (31)優先権主張番号 (32)優先日 (33)優先権主張国	特願平5-265171 平成5年(1993)10月22日 特願平4-291719 平4(1992)10月29日 日本 (JP)	(71)出願人 株式会社三井業際植物バイオ研究所 東京都港区赤坂2-5-27 八千代ビル4F (72)発明者 馬場 忠 茨城県つくば市並木2丁目103-102 (72)発明者 島田 浩章 茨城県土浦市富士崎1丁目1-13-406 (74)代理人 弁理士 遠山 勉 (外3名)
---	---	---

(54)【発明の名称】 新規なイネ澱粉枝つけ酵素遺伝子

(57)【要約】

【目的】 アミロベクチン合成に重大な影響を及ぼす新規な澱粉枝つけ酵素の遺伝子を単離し、食糧増産、食味の優れた米の生産、植物とくにイネの育種を行う。

【構成】 新規イネ澱粉枝付け酵素遺伝子の全部あるいは一部を、該遺伝子プロモーターまたは植物細胞内で発現可能なプロモーターに順方向又は逆方向に結合したDNA配列を、イネ等の植物に導入し、澱粉枝付け酵素遺伝子を発現させ、又はアンチセンスRNAを発現させることにより、穀粒中の澱粉のアミロース、アミロベクチン含量を変化させる。

1

2

## 【特許請求の範囲】

【請求項1】 配列番号1に示す塩基配列を有するイネ澱粉枝つけ酵素遺伝子のcDNA。

【請求項2】 配列番号1に示す66～825番のアミノ酸配列を有するイネ澱粉枝つけ酵素の成熟タンパクをコードする遺伝子。

【請求項3】 配列番号1に示す1～65番のアミノ酸配列を有するイネ澱粉枝つけ酵素のトランジット蛋白をコードする遺伝子。

【請求項4】 配列番号4に示す塩基配列中に含まれるイネ澱粉枝つけ酵素遺伝子のプロモーター。 10

【請求項5】 配列番号1に示すアミノ酸配列の全部あるいは一部をコードするDNA配列と、植物細胞内で発現可能なプロモーターとを結合したDNA配列を導入した植物細胞。

【請求項6】 配列番号1に示すアミノ酸配列の全部あるいは一部をコードするDNA配列と、植物細胞内で発現可能なプロモーターとを結合したDNA配列を導入したイネ。

【請求項7】 前記プロモーターが、請求項4記載のプロモーターであることを特徴とする請求項5記載のイネ。

【請求項8】 請求項6又は7記載のイネを栽培することにより得られる穀粒。

【請求項9】 配列番号1に示すアミノ酸配列の全部あるいは一部をコードするDNA配列と、植物細胞内で発現可能なプロモーターとを結合したDNA配列を、植物細胞内に導入することによってイネ澱粉枝付け酵素活性を変化させる方法。

【請求項10】 前記プロモーターが、請求項4記載のプロモーターであることを特徴とする請求項9記載のイネ澱粉枝付け酵素活性を変化させる方法。

【請求項11】 請求項4記載のプロモーターと異種遺伝子とを結合したDNA配列を、植物細胞内に導入することによって、種子特異的に前記異種遺伝子を発現させること。

## 【発明の詳細な説明】

## 【0001】

【産業上の利用分野】 本発明は、新規イネ澱粉枝つけ酵素の遺伝子及びこれを用いた植物細胞中のイネ澱粉酵素活性を変化させる方法に関する。

## 【0002】

【従来の技術】 穀類は我々にとって主要なカロリー供給源であり、かつ脂質やタンパク質の重要な摂取源である。したがって、穀類胚乳貯藏成分の質的・量的改良は主要な育種目標となっている。

【0003】 この目標達成のためには、穀類胚乳中の貯蔵成分に関する遺伝資源の探索・収集とその遺伝・育種学的評価が必要である。例えば、トウモロコシでは胚乳成分に関する多様な遺伝的変異(突然変異)が見出され

ており、それらはトウモロコシの品質改良に重要な役割を果たしている。さらに、これらの突然変異は生体内での遺伝的制御機構の解明を行なう際の貴重な情報となるが、これらに関する遺伝子の構造や発現調節機構は解明されていない。

【0004】 一方、イネは粒食が主体であり、胚乳澱粉中の多糖類の含有比率や澱粉の構造的变化が、コメの食味や調理特性を大きく変え、穀粒中の澱粉含量は食味や加工特性と密接な関係がある。澱粉合成のメカニズムとして3つの段階が考えられており、まず、澱粉合成の雰型となるオリゴサッカライドの合成、これの伸長反応、さらにはできた直鎖形の澱粉の枝つけ反応の順で合成される。澱粉合成に関する酵素蛋白としてはワキシー蛋白などの澱粉顆粒に結合型の澱粉合成酵素や可溶性の澱粉合成酵素が知られており、アミロベクチン合成に関与する澱粉枝つけ酵素も数種類存在することが知られている。しかし、これらの酵素蛋白についての知見はほとんど得られていない。

【0005】 ところで、澱粉は光合成の最終産物であり、穀類の主要成分であって、その生合成に関する研究は、植物生理、生化学における重要な課題の1つとなっている。澱粉はグルコースが $\alpha$ (1→4)結合した直鎖形のアミロースと、 $\alpha$ (1→6)結合による枝分れ構造をもつアミロベクチンから構成されている。植物における澱粉顆粒中のアミロース、アミロベクチンの含量比は、植物種や品種によってそれぞれ固有の値をもっており、その高次構造もまた特有の形態をとっていることが知られている。

【0006】 澱粉生合成の主酵素である澱粉合成酵素は、ADPグルコースあるいはUDPグルコースを基質とし、アミロース分子の合成を行なう。これに対し、アミロベクチン分子は、 $\alpha$ (1→4)結合を作る澱粉合成酵素と、 $\alpha$ (1→6)結合をつくる枝付け(プランチング)酵素が協調的に作用することによってつくられる。アミロベクチンの枝分れ構造の形成機構に関する研究は、グリコーゲンでの枝分かれの機構の研究を参考にして進められており、植物においてもグリコーゲンの枝付け酵素とよく似た性質の酵素が存在することが示唆されている。しかし、その遺伝子に関する研究、あるいは遺伝的調節機構についての研究はあまり進んでいなかった。

## 【0007】

【発明が解決しようとする課題】 本発明は、上記した技術の現状に鑑み、イネの遺伝子のうち、とりわけアミロベクチン合成に重大な影響を及ぼす新規な澱粉枝つけ酵素に着目し、その遺伝子を単離し、食糧増産、食味の優れた米の生産、植物とくにイネの育種を行うことを課題とする。

## 【0008】

【課題を解決するための手段】 本発明者は、上記課題を解決するために銳意研究を行った結果、新規な澱粉枝つ

け酵素を見出し、この酵素蛋白のアミノ酸配列を明らかにするとともに、その遺伝子を単離し、本発明に至った。

【0009】すなわち本発明は、配列番号1に示す塩基配列を有するイネ澱粉枝つけ酵素遺伝子のcDNA、配列番号1に示す66～825番のアミノ酸配列を有するイネ澱粉枝つけ酵素の成熟タンパクをコードする遺伝子、配列番号1に示す1～65番のアミノ酸配列を有するイネ澱粉枝つけ酵素のトランジット蛋白をコードする遺伝子、及び配列番号4に示す塩基配列中に含まれるイネ澱粉枝つけ酵素遺伝子のプロモーターである。

【0010】本発明は、また、配列番号1に示すアミノ酸配列の全部あるいは一部をコードするDNA配列と植物細胞内で発現可能なプロモーターとを結合したDNA配列を導入した植物細胞あるいはイネ、及びこのイネを栽培することにより得られる穀粒を提供する。

【0011】さらに、本発明は、配列番号1に示すアミノ酸配列の全部あるいは一部をコードするDNA配列と植物細胞内で発現可能なプロモーターとを結合したDNA配列を植物細胞内に導入することによってイネ澱粉枝付け酵素活性を変化させる方法、イネ澱粉枝付け酵素遺伝子プロモーターと異種遺伝子とを結合したDNA配列を、植物細胞内に導入することによって種子特異的に前記異種遺伝子を発現させる方法を提供する。

【0012】本発明のイネ澱粉枝つけ酵素遺伝子には、アミロblastにイネ澱粉枝つけ酵素を効率的に移行する能力を有するトランジットペプチドをコードする遺伝子も含まれている。本明細書においては、特記しない限り、「澱粉枝付け酵素」とは、トランジットペプチドを含めた酵素、あるいはトランジットペプチドを除いた酵素をいい、特にトランジットペプチドを除いた酵素を「成熟酵素」という。また、澱粉枝付け酵素cDNAを遺伝子として使用する場合は、これを「澱粉枝付け酵素遺伝子」という。

【0013】以下、本発明を詳細に説明する。本発明に係るイネ澱粉枝付け酵素は、新規な酵素であり、III型と名付けたものである。本発明者は後述するように、イネ澱粉枝付け酵素を3種に分画し、各々I、II、III型と名付けた。

【0014】これらのうちIII型の酵素による澱粉合成は動物のグリコーゲン合成の際の枝つけ反応と類似であり、大腸菌のグリコーゲン枝つけ酵素とも相同性がある。この反応のメカニズムについてはあまり明らかではないが、種子澱粉形成初期のアミロベクチン合成に重要な役割を果たしており、この酵素の欠如したイネではきわめて高アミロース含量となる。したがって、この酵素の活性を高めることは穀粒中のアミロベクチン含量を高めることにつながる。そのため、作物育種上、この酵素活性を高めることは大きな意義がある。

【0015】低アミロース化にはアミロース合成系を抑 50

えることによって結果的にアミロベクチン含量を高める方法と、アミロベクチンを合成する経路を強化しその含量を積極的に増大せしめる方法がある。後者の場合、澱粉生産量のを高めることにもなるので、イネの育種目標としては非常に優れているものと考えられる。

【0016】<1>III型イネ澱粉枝付け酵素遺伝子  
遺伝子を単離するには、例えば、酵素を精製し、アミノ酸配列を決定し、この配列をもとに合成オリゴヌクレオチドプローブを作製し、ハイブリダイゼーションにより 10 遺伝子ライブラリーから選択する方法がある。そのために、イネから澱粉枝付け酵素を精製する方法を以下に例示する。

【0017】イネの登熟種子を氷冷しながらジューサーを用いて粉碎し、50mM Tris-HCl(pH8.5)、5mM EDTA、5mMメルカプトエタノールを含む緩衝液に懸濁する。不溶性の画分を濾過と遠心分離によって取り除いたあと、硫酸アンモニウムを加えて総蛋白質を沈澱させる。沈澱した蛋白画分を50mM Tris-HCl(pH7.5)、5mM EDTA、5mMメルカプトエタノールからなる緩衝液に溶解し、透析後DE 20 AB-セルロース(Whatman DE-52)を用いてクロマトグラフィーを行う。イネ澱粉枝付け酵素を含む画分は、BoyerとPreissの方法(Carbohydrate Res. 61, 321-334 (1978))で検定することができる。

【0018】こうして、イネ澱粉枝付け酵素は3つの部分にわかれ得られ、それぞれをI型、II型、III型とした。活性画分は、さらにToyopearl HW55Pを用いたゲル滌過カラムクロマトグラフィーにより、SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動(SDS-PAGE)により単一のバンドとして分離精製され、いずれも新規な酵素である。そのうちIII型の酵素は87kDaの位置に泳動されるタンパクである。

【0019】このようにして精製した酵素のN末端のアミノ酸配列を決定すれば、この配列をもとにプローブを作製することができる。本発明において決定されたIII型の澱粉枝付け酵素のN末端のアミノ配列を、配列番号2に示した。

【0020】尚、同様にしてI、II型の酵素及びその遺伝子も得たが、これらの酵素は同一の遺伝子産物であり、転写後の切断等により2種類に分かれる推定している。また、これらの酵素はIII型の酵素と抗原抗体反応上、全く異なる。

【0021】<2>イネ登熟種子由来のcDNAライブラリーの構築  
cDNAライブラリーは、イネ登熟種子からmRNAを抽出し、逆転写酵素を用いてcDNAを合成し、ポリメラーゼ反応によって2本鎖化したものをベクターに挿入し、大腸菌等に形質転換することにより作製することができる。cDNAクローニングキットが市販されているのでこれらを使用してもよい。

【0022】ライブラリーの作製に用いるベクターは、

多数種市販されており、これらを使用することができる。DNAの切断、連結、形質転換、遺伝子の塩基配列の決定、ハイブリダイゼーション等一般の遺伝子組換えに必要な方法は、各操作に使用する市販の酵素等に添付されている説明書や、Molecular cloning (Maniatis T. et al. Cold Spring Harbor Laboratory Press)に記載されている。

【0023】<3>澱粉枝付け酵素cDNA及び染色体遺伝子のクローニングと植物細胞における発現

精製した酵素から決定したアミノ酸配列をもとに作製したプローブを用い、ブラークハイブリダイゼーション等を行うことにより、cDNAライブラリーあるいは染色体DNAライブラリーから澱粉枝付け酵素遺伝子を得ることができる。

【0024】得られた遺伝子の全部あるいは一部をプローブとして用い、ブラークハイブリダイゼーション等により、染色体DNAライブラリーから澱粉枝付け酵素遺伝子をスクリーニングすることができる。同様にして、植物の遺伝子ライブラリーから他の澱粉枝付け酵素遺伝子を選択することができ、こうして得られる遺伝子も本発明に使用することができる。

【0025】クローン化されたcDNAあるいは染色体DNAの塩基配列の決定は、Maxam-Gilbert法あるいは、ダイデオキシ法により行う。ダイデオキシ法による塩基配列の決定は、市販されているキットを用いて行うことができ、配列決定を自動的に行うオートシーケンサーを使用してもよい。

【0026】このようにして得られたIII型の澱粉枝付け酵素cDNAの塩基配列、及びこの配列から推定されるアミノ酸配列を配列番号1に示した。また、染色体DNAライブラリーから得られた澱粉枝付け酵素遺伝子のプロモーター領域を、配列番号4に示す。

【0027】このアミノ酸配列をコードする遺伝子の全部あるいは一部をカリフラワーモザイクウイルス由來のプロモーターなど植物で発現可能なプロモーターと結合することによって、人工的な澱粉枝付け酵素の発現系を構築することができる。

【0028】また、前記澱粉枝付け酵素遺伝子の全部又は一部を、逆方向にプロモーターに結合したものを植物に導入し、いわゆるアンチセンスRNAを発現させることによって、澱粉枝付け酵素遺伝子mRNAの翻訳を阻害し、酵素生産量を抑制させることができる。

【0029】さらに、プロモーターとして澱粉枝付け酵素遺伝子のプロモーターと、澱粉枝付け酵素遺伝子あるいは異種遺伝子とを連結して得られるDNA断片を植物に導入すると、種子特異的にこれらの遺伝子を発現させることができる。

【0030】このようにして構築された発現系を、イネ、トウモロコシなどの植物に導入することにより、植物の形質転換を行い、形質転換植物の澱粉の含量を任意

に変化させることができる。同様にして異種遺伝子をこれらの植物で発現させることができる。

【0031】本発明にいう、配列番号1に示すアミノ酸配列の全部あるいは一部をコードするDNA配列と、植物細胞内で発現可能なプロモーターとを結合したDNA配列とは、各々を順方向あるいは逆方向に連結したものの、すなわちイネ澱粉枝付け酵素遺伝子を発現させるものと、同遺伝子のアンチセンスRNAを発現させるものを含む。これは、異種遺伝子においても同様である。

【0032】植物の形質転換は、エレクトロポレーション（電気的穿孔法）あるいはアグロバクテリウムのT1プラスミドを利用する方法などによって、プロトプラストにDNAを導入することによって行うことができる。以下に、イネにおける、プロトプラストの調製、エレクトロポレーションによるプロトプラストへのDNAの導入、及び形質転換細胞の植物体への再生法を例示する。

【0033】イネのプロトプラストの調製は、例えば以下のようにして行う。イネの種子未成熟胚から形成させたカルスを、R2無機塩(Ohira, K. et al. Plant Cell Physiol. 14, 1113 (1973))、B5ビタミン(Gamborg, O. et al. Expt. Cell Res. 50, 151 (1968))、0.3%カゼイン水解物、1ppmの2,4-D、及び3%スクロースを含む液体培地に移し、25℃、500ルクスの蛍光灯光の照射下で、60rpmに設定したロータリーシェーカーで培養する。

【0034】一週毎に、新鮮な上記培地でサブカルチャーを行い、サブカルチャー5日目の細胞1gを、1%マセロzyme(Macerozyme) R10、4%セルラーゼRS(以上、(株)近畿ヤクルト製)、0.5%CaCl<sub>2</sub>・2H<sub>2</sub>O、0.0.5%デキストラン硫酸カリウム、0.4Mマンニトールを含む10mlの酵素溶液と混合する。

【0035】この溶液のpHを5.5に調整し、27℃で3時間振盪(40rpm)し、続いて3時間静置する。酵素処理により生じたプロトプラスト懸濁液を、40μmのナイロンスクリーンを通して破碎物を除く。

【0036】このようにして得られるプロトプラストへ、エレクトロポレーションによりDNAを導入する方法(Tada, Y. et al. Theor. Appl. Genet. 80, 475 (1990))を説明する。

【0037】プロトプラストを、エレクトロポレーション緩衝液(70mM KCl、5mM CaCl<sub>2</sub>、5mM 2-[モルヒネ]イソルボン酸(MES)、0.4Mマンニトール)に、2×10<sup>6</sup>個/m<sup>2</sup>となるように懸濁し、0~20μgのDNAを加える。DNAとしては、導入するDNA(澱粉枝付け酵素遺伝子を含むDNA)の他にハイグロマイシン耐性遺伝子を発現するプラスミドを加える。ハイグロマイシン耐性遺伝子を発現するプラスミドが導入されたプロトプラストには、導入しようとするDNAも同時にco-transformationされる確率が高いので、ハイグロマイシンを用いた選択により、効率よく形質転換細胞を選択すること

ができる。

【0038】プロトプラストとDNAの混合液を0℃で20分間放置した後、氷冷したエレクトロポレーション・チャンバに移し、電気パルスを与える。電気パルスは、例えば、初期電界475V/cm、時間減衰係数 $T_{1/2}$ が30.0ミリ秒となるように与える。エレクトロポレーションには、装置が市販されているのでこれを使用すればよい。電気パルスは、例えば、初期電界475V/cm、時間減衰係数 $T_{1/2}$ が30.0ミリ秒となるように与える。

【0039】次に、上記のようにして得られた形質転換細胞の植物体への再生法(Fujimura, T. et al. Plant Tissue Culture Lett. 2, 74(1985))を説明する。エレクトロポレーションを行ったプロトプラストを、遠心分離(50×g、5分)により、R2無機塩、0.4Mグルコースを含む洗滌培地で4回洗滌した後、2ppmの2,4-D、0.5ppmベンジルアデニン、3%スクロースを添加したN6培地(Chu, C.-C. Proceedings of Symposium on Plant Tissue Culture (Scientific Press, Peking) p.43 (1978))に懸濁し、細胞数を $10^6$ 個/mLに調整して25℃、暗下で培養する。

【0040】培養14日目に、培地にハイグロマイシンを $50\mu g/mL$ 添加し、さらに2週間培養し、コロニーを同濃度のハイグロマシンを含む新鮮な培地に移す。コロニーが直径2mmまで生育したら、ハイグロマイシンを含まないN6ホルモンフリー培地に移し、蛍光灯照射下(3000ルクス)で培養して分化させる。試験管内で高さが約10cmに生長した苗を、順化させた後に温室内のポットに移し、植物体まで再生させる。

【0041】澱粉枝付け酵素遺伝子が含まれているクローンの選択は、カルスあるいは植物体の細胞を探り、サザンハイブリダイゼーション等の方法で確認することにより行えばよい。また、再生後に、植物体の葉の抽出液等のタンパク中の酵素量をウエスタン解析等により調べる一方、澱粉枝付け酵素遺伝子が導入されていることをサザン解析等により確認することが好ましい。

#### 【0042】

<4>トランジットペプチドをコードする配列の利用  
澱粉枝付け酵素は、アミロプラストに効率的に移行するための配列であるトランジットペプチドをN末端側に有している。配列番号1に示した澱粉枝付け酵素遺伝子には、このトランジットペプチドをコードする部分も含まれており、128~322番の塩基配列がこれに相当する。

【0043】このトランジットペプチドをコードする配列の下流に、任意のタンパクをコードする配列をフレームを併せて連結すると、これらの配列を植物細胞中で発現させた際に、このタンパクをアミロプラストに効率的に移行させることができる。

【0044】<本発明の応用>本発明によれば、III型 50

のイネ澱粉枝つけ酵素のトランジットペプチドと酵素活性を有する蛋白のアミノ酸配列が明らかになったので、これらを利用してIII型のイネ澱粉枝つけ酵素のイネにおけるまたはイネ以外の植物での大量生産が可能となり、イネなどの新たな育種に本発明は利用できる。従って、本発明は植物育種の領域、III型のイネ澱粉枝つけ酵素の工業的生産に利用することができ、植物、食品製造、酵素工業等の技術分野においてきわめて有用である。

10 【0045】本発明によって初めて、トランジットペプチドをコードする遺伝子を含むIII型のイネ澱粉枝つけ酵素遺伝子のクローニング及び構造解析に成功した。従って、本発明が各種の著効を奏すことができ、以下にその一例を示す。

【0046】既述したように、本発明によって得られたIII型のイネ澱粉枝つけ酵素のcDNAは配列番号1に示すようにこの酵素蛋白の全領域をコードしている。したがって、このcDNAの塩基配列とカリフラワー毛ザイクウイルス由来のプロモーターなどと結合することによって人工的なIII型の澱粉枝つけ酵素の発現系を構築することが可能となった。構築された人工遺伝子をイネ、タバコなどの植物に電気的穿孔法あるいはアグロバクテリウムを利用した方法などによって導入することが可能であり、その結果、得られた形質転換植物のIII型の澱粉枝つけ酵素の生産量を増大させることができる。またアンチセンス技術を利用することによって、種子中のアミロース含量を高めることができた。

30 【0047】本発明のIII型のイネ澱粉枝つけ酵素のcDNAにコードされているトランジットペプチドはイネにおいて後続する蛋白を効率的にアミロプラストに移行させる能力を有する。したがって、トランジットペプチドをコードする塩基配列の後にIII型の澱粉枝つけ酵素をコードする塩基配列に代えて、任意の蛋白をコードする塩基配列を結合した場合、その蛋白を効率的にアミロプラストに移行させることができる。

【0048】さらに、III型の澱粉枝つけ酵素の酵素活性を有する蛋白をコードしている塩基配列は、インビトロの転写系などの人工的な手法、あるいは大腸菌などの微生物を用いて遺伝子の発現を行なうことによって、II 40 I型の澱粉枝つけ酵素を大量に、かつ純粋な形で得ることができる。得られたIII型の澱粉枝つけ酵素は効率的に澱粉合成を行なう酵素活性を有することから、澱粉の量的改変を行なう際に有効である。またこの酵素処理を行なうことによって澱粉の質的向上を図ることが可能となった。

【0049】本発明のcDNAの塩基配列を用いて、部位特異的置換あるいはPCR法などの手法を用いてこれを塩基配列の一部を特異的に変異せしめ、III型の澱粉枝つけ酵素の機能向上を求める研究に用いることができる。また同時に酵素蛋白の機能発現に関する研究にも用

いることができる。

【0050】

【実施例】以下に、本発明の実施例を説明する。操作の手順は特に記述しない限りCurrent Protocols in Molecular Biology(F. M. Ausubelら編集, John Wiley& Sons, Inc., 1987)に記載されている方法にしたがった。

【0051】

【実施例1】 III型のイネ澱粉枝つけ酵素cDNAの取得とその利用

<1>III型のイネ澱粉枝つけ酵素の精製と性質の解析  
圃場で育てたコシヒカリ品種のイネの登熟種子を氷冷しながらジューサーを用いて粉碎し、50mM Tris-HCl(pH8.5)、5mM EDTA、5mMメルカプトエタノールを含む緩衝液に懸濁した。不溶性の画分をろ過と遠心分離によって取り除いたあと、硫酸アンモニウムを加えて総蛋白質を沈澱させた。沈澱した蛋白画分を50mM Tris-HCl(pH7.5)、5mM EDTA、5mMメルカプトエタノールからなる緩衝液に溶解し、透析後DEAE-セルロース(Whatman DE-52)を用いてクロマトグラフィーを行なった。

【0052】イネ澱粉枝つけ酵素を含む画分は、BoyerとPreissの方法(Carbohydrate Res. 61, 321-334 (1978))で検定した。その結果、イネ澱粉枝つけ酵素はI型、II型、III型と名付けた3つの部分に分かれた。次に、活性画分をToyopearl HW55Fを用いたゲルろ過カラムクロマトグラフィーを行なった。III型の澱粉枝つけ酵素はSDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動(SDS-PAGE)により87kDaの単一な蛋白のバンドとして分離精製された。

【0053】精製されたIII型のイネ澱粉枝つけ酵素を抗原としてウサギ抗血清を作製し、後ウェスタンブロッティング解析等に用いた。

【0054】<2>III型のイネ澱粉枝つけ酵素のN-末端アミノ酸配列の決定

前述のIII型のイネ澱粉枝つけ酵素溶液をSDS-PAGEによって分離し、イネ澱粉合成酵素活性を有する蛋白のバンドから蛋白質を取り出し、PVDFメンブラン(ミリボア)に吸着させた。これを、蛋白分析装置(Applied Biosystems Inc製)を用いてN-末端からそのアミノ酸配列を調べた。その結果、配列番号2に示すアミノ酸配列が得られた。尚、配列中15番目のアミノ酸は、Ser又はCysのいずれかであると判定された。

【0055】

<3>イネ登熟種子由來のcDNAライブラリーの構築  
イネニッポンバレ登熟種子20gより塩化リチウム法に準じて全RNAを調製した。さらに、オリゴdTセルロースカラムクロマトグラフィーにより、mRNAを含むポリア-RNAを単離し、それを鏡型としてオリゴdTプライマーと逆転写酵素を用いてcDNAを合成した。全RNAからcDNAへの調製にはファルマシア製のcDNA合成キットを用いた。得られたcDNAはλgt11アームとcDNAを連結後、in vitroパッ

ケージングキット(Stratagene社製、GIGAPACK Gold)を用い、パッケージングを行ない、大腸菌Y1090株に感染させることによって多数の組換えλファージを得た。これをイネ登熟種子のcDNAライブラリーとした。ライブラリーの大きさは $3.3 \times 10^6$ であった。

【0056】

<4>イネ澱粉枝つけ酵素cDNAのクローニング

前述のイネ澱粉枝つけ酵素のN-末端のアミノ酸配列からDNAの塩基配列を推定し、このアミノ酸配列に対応する合成DNA(配列番号2のアミノ酸配列中8~20番目のアミノ酸配列に相当)を作製した。その配列を配列番号3に示す。尚、配列中他の塩基(N)はイノシン酸である。

【0057】前述のイネcDNAライブラリーの中のおよそ300,000個の独立したブラークを、寒天培地上に形成させ、これをニトロセルロース膜に転写後、前述の合成DNAを<sup>32</sup>Pラベルしたものをプローブとして用い、イネ澱粉枝つけ酵素のcDNAのスクリーニングを行なった。その結果、3個の陽性を示すクローニングが得られた。これらのファージDNAを調製し、この挿入断片は、ファージDNAを制限酵素EcoRIで限定分解することによって単離した。さらにこの断片をプラスミドpUC119のEcoRI部位に挿入することによって、プラスミドクローン(pRB33)としてcDNAを得た。

【0058】

<5>澱粉枝つけ酵素cDNAの塩基配列の解析

pRB33に含まれる塩基配列の決定をダイデオキシ法により(Messing, Methods in Enzymol., 101, 20-78 (1983))行った。これにより得られた塩基配列及びこの配列から推定されるアミノ酸配列を配列番号1に示す。

【0059】このアミノ酸配列の中で、トランジットペプチドに対応する配列は、128~322番目の塩基配列によってコードされる配列(アミノ酸番号1~65)であり、成熟酵素に対応する配列は、323~2602番目の塩基配列によってコードされる配列(アミノ酸番号66~825)である。

【0060】上記アミノ酸配列を、澱粉合成酵素のタンパクから決定したアミノ酸配列と比較したところ、一致する配列が見いだされ、ブラークハイブリダイゼーションにより単離されたcDNAが澱粉枝つけ酵素のcDNAであることが確認された。さらに詳細な塩基配列の検討を行ない、この酵素がアミロblastへ移行するために重要な働きを行なうトランジットペプチドを有することが明らかとなった。

【0061】尚、同様にして取得し、決定したI型の澱粉枝つけ酵素の遺伝子は、III型の酵素の遺伝子との相同意性はほとんどなく、30%以下であった。

【0062】<6>III型のイネ澱粉枝つけ酵素遺伝子のアンチセンス遺伝子の構築とイネの形質転換

前項と同様にEcoRI切断により、III型のイネ澱粉合成酵

11

素の遺伝情報を全領域を含む断片を単離したあと、T4 DNA polymeraseを用いて末端を平滑化した。これをpBI221のSmaI部位に逆方向にクローニングし、プラスミドpBIRBE3Rを得た。pBIRBE3Rは、pBI221に由来するカリフラワーモザイクウイルスの35Sプロモーターの下流に、III型の澱粉枝つけ酵素のcDNAがアンチセンス遺伝子の方向で結合して存在する。したがって、このプラスミドにのっているIII型の澱粉枝つけ酵素の遺伝情報は、前記35Sプロモーターによって発現し、アンチセンスRNAとして転写される。

【0063】pBIRBE3Rを用いたイネの形質転換を、前述の方法により行った。尚、ハイグロマイン耐性遺伝子を有するプラスミドとして、10 μgのpUC19-HPTを用い、20 μgのpBIRS3とともに、イネ(ニッポンパレ)の胚細胞由来のプロトプラストに導入した。

【0064】エレクトロポレーションは、初期電圧4.75 V/cm、 $T_{1/2}$ が30ミリ秒である電気パルスを与えることにより行った。形質転換されたイネは8株得られた。形質転換株から得られた登熟種子の粗抽出液を用いて、前述の抗血清を使ったウエスタン分析を行なったところ、目的とするIII型の澱粉枝つけ酵素の発現量が対照として用いたニッポンパレに比べて著しく低とへ6いことが確認された。また、得られた種子のアミロース含量をヨード呈色法で測定した結果、対照に比べて著しく高いこと(30-40%)がわかった。

【0065】本実施例とは逆に、III型の澱粉枝つけ酵素cDNAをプロモーターに順方向に連結すれば、アミロース含量の低いイネを作製することができる。

【0066】

【実施例2】 III型の澱粉枝つけ酵素遺伝子プロモーター領域の取得とその利用

【0067】<1>イネゲノムDNAの調製とゲノムライブラーの構築

材料としたイネ核DNAは、RogersとBendichの方法(Plant Mol. Biol. 5, 69 (1985)に従って調製した。得られたDNAを制限酵素Sau3AIで限定分解し、さらにショ糖密度勾配遠心分離を行なって10kb以上の断片を得た。これらの断片を、BamHIで切断したpEMBL3ファージのアームと連結後、インピトロ・パッケージングキット(Stratagene社製、GIGAPACK Gold)を用い、パッケージングを行ない、大腸菌LE392株に感染させることによって多数の組換えファージを得た。これをイネゲノムDNAライブラーとした。ライブラーの大きさは $1.6 \times 10^6$ であった。

【0068】<2>III型のイネ澱粉枝つけ酵素遺伝子のプロモーター領域の単離

前述のイネゲノムライブラーの中のおよそ100,000個の独立したブラークを、実施例1で得られたIII型のイネ澱粉枝つけ酵素のcDNAをプローブとして、イネ枝つけ酵素遺伝子のプロモーター領域のスクリーニングを行な

50

12

った。この結果、10個の陽性クローニングが得られた。これらの陽性クローニングからファージDNAを調製し、挿入断片の大きさを調べた。その結果、得られたファージクローニングは同一の断片に由来することが示唆された。これらのファージクローニングのうち一つを選択し入RB3と命名した。

【0069】入RB3ファージゲノムに含まれる挿入フレグメントは、制限酵素SalIで切断した場合4つの断片に分かれた。さらに、前述のcDNAの5'領域をプローブとして、サザン分析を行ない、プロモーター領域を含む断片を特定した。プロモーター領域を含む断片は、入RB3を制限酵素EcoRIとBamHIによって切断することによって得られ、これをpUC118のEcoRIとBamHIによる切断断片に挿入し、得られたプラスミドをpRBP1と名付けた。

【0070】<3>III型のイネ澱粉枝つけ酵素遺伝子のプロモーター領域の構造解析

上記で得られたpRBP1の挿入断片の塩基配列を、ダイデオキシ法によって決定した。プロモーター領域は、得られた塩基配列と前述のcDNAの塩基配列とを比較し、プロモーターに共通に見られる配列(TATA配列など)を調べること、および、ノーザン分析等を行なうことによってその構造を明らかにした。

【0071】このようにして構造解析されたIII型のイネ澱粉枝つけ酵素の遺伝子のプロモーター領域の塩基配列を、配列表の配列番号4に示した。この領域には、一般にプロモーターに存在することが知られている因子に対応する塩基配列の存在が認められた(配列表参照)。

【0072】<4>III型のイネ澱粉枝つけ酵素遺伝子のプロモーターの単離

pRBP1に含まれるプロモーターをPCR法によって単離するため、2種の合成DNAプライマーを合成した。5'側のプライマーは、配列番号4中塩基番号4~23に示す配列(配列番号5)を有し、3'側のプライマーは、配列番号4中塩基番号995~1115に相補的な配列(配列番号6)を有する。これらのプライマーを用いてpRBP1のPCR法による增幅を行ない、およそ1000bpの断片を増幅した。得られた断片をpUC118のHincIIサイトに挿入し、pRBP2を得た。この挿入断片の塩基配列を決定したところ、枝つけ酵素遺伝子のプロモーターに対応することが明かとなった。ここで得られたpRBP2は、III型のイネ枝つけ酵素遺伝子のプロモーター配列の下流にXbaIおよびBamHI、SmaIサイトが存在する。従って、これらの制限酵素切断部位を利用して異種の遺伝子を接続することが可能である。

【0073】<5>III型のイネ枝つけ酵素遺伝子のプロモーターとGUS遺伝子が連結した遺伝子の構築

$\beta$ -グルクロニダーゼ(GUS)遺伝子を有するプラスミドpBI221 (Jefferson et al.; EMBO J. 6, 3901 (1987) pBI221はClontech社より入手)をBamHIとSstIにより切断してGUS遺伝子領域を切り出し、切断末端をT4 DNAポリメ

13

ラーゼ(宝酒造製、DNA blunting kit)を用いて平滑化した。これを、前述のIII型のイネ枝つけ酵素遺伝子のプロモーターを有するプラスミドpRBP2のSmaI部位に挿入した。

【0074】こうして、III型のイネ枝つけ酵素遺伝子のプロモーターの下流にGUS遺伝子が結合した人工遺伝子が作製された。これをpRBG1と名付けた。

【0075】<6>III型のイネ枝つけ酵素遺伝子のプロモーターとGUS遺伝子が連結した人工遺伝子のイネへの導入

pRBG1のプラスミドを、前述のTadaらの方法に従い、イネ(ニッポンバレ)のプロトプラスト細胞にエレクトロポーリーション法によって導入した。得られた細胞は、前述のFujimuraらの方法に従い、植物体に再生した。これらの細胞より、DNAを抽出し、サザンハイブリダイゼーションを行なったところ3株にpRBG1に由来すると思われるDNA断片が存在していた。これらの形質転換植物の種子のGUS活性を多田らの方法(Tada et al., EMB0 J., 10, 1803-1808 (1991))に従って調べたところ、形質転換植物の種子は高いGUS活性を示した。

【0076】このことから、III型のイネ澱粉枝つけ酵素遺伝子のプロモーターを用いて異種遺伝子を種子特異的に効率よく発現させることができることがわかった。したがって、III型の枝つけ酵素のプロモーターを用いれば、イネの種子中に各種の遺伝子産物を蓄積することが可能であることがわかった。

【0077】<7>III型のイネ澱粉枝つけ酵素遺伝子のプロモーターとcDNAの結合によるセンス遺伝子の構築。

III型のイネ澱粉枝つけ酵素遺伝子のcDNAを有するプラスミドpRB33をEcoRIで切断し、切断末端をT4 DNAポリメラーゼ(宝酒造製、DNA blunting kit)を用いて平滑化した。これを前述のIII型のイネ澱粉枝つけ酵素遺伝子のプロモーターを有するプラスミドpRBP2のSmaIによる切断断片との結合を行なった。この結果、III型の枝つけ酵素遺伝子のプロモーターの下流にIII型の枝つけ酵素遺伝子がセンスの向きにつながったセンス枝つけ酵素遺伝子が作成された。これを、pRBPRB3と名付けた。

【0078】

<8>センスIII型枝つけ酵素遺伝子のイネへの導入  
pRBPRB3プラスミドDNAを、<6>で述べた方法で、イネ細胞に導入した。再生植物体細胞よりDNAを抽出し、サザンハイブリダイゼーションを行なったところ、5株にpRBPRB3に由来するDNA断片が存在していた。これらの形質転換植物から種子をとり、その胚乳での枝つけ酵素の活性をフォスフォリラーゼ法(中村道徳、貝沼圭二編、澱粉、関連糖質酵素実験法、学会出版センター、1989)によって定量した。その結果、得られた植物体5株の枝つけ酵素活性は、コントロールとした無処理の植物に比べ105%から125%であり、これらの平均では約15%増大し

14

ていた。

【0079】これらの結果から、本発明のセンスIII型澱粉枝つけ酵素遺伝子を導入することにより、形質転換植物の胚乳中での澱粉枝つけ酵素活性を増大させることができることが可能であることが示唆された。このことによって胚乳デンプンでのアミロベクチン含量を増加させることが可能となることが示唆された。

【0080】<9>III型のイネ澱粉枝つけ酵素遺伝子のアンチセンス遺伝子の構築とイネの形質転換

10 イネ澱粉合成酵素の遺伝情報の全領域を含む断片を単離したあと、T4 DNAポリメラーゼを用いて末端を平滑化した。これをpBI221のSmaI部位に、pBI221に含まれるカリフラワーモザイクウイルスの35Sプロモーターの転写方向に逆方向となるようにクローニングし、プラスミドpBIRBE3Rを得た。すなわち、III型の澱粉枝つけ酵素のcDNAは、前記プロモーターにアンチセンス遺伝子の方向で結合して存在し、この遺伝子の遺伝情報は35Sプロモーターによって発現すると、アンチセンスRNAが作られる。

20 【0081】pBIRBE3Rを電気的穿孔法を用いてイネ(ニッポンバレ)プロトプラストに導入した。形質転換されたイネは8株得られた。形質転換株から得られた登熟種子の素抽出液を用いて、前述の抗血清を使ったウエスタン分析を行なったところ、目的とするIII型の澱粉枝つけ酵素の発現量が対照として用いたニッポンバレに比べて著しく低いことが確認された。また、得られた種子のアミロース含量をヨード呈色法で測定した結果、対照に比べて著しく高いこと(30~40%)がわかった。

【0082】

30 【発明の効果】本発明のIII型のイネ澱粉枝つけ酵素のcDNAによって規定されるアミノ酸配列を有する酵素蛋白はイネで有効に発現し、穀粒中の澱粉のアミロース、アミロベクチン含量に関与するため、この塩基配列をイネに導入することによって穀粒に含まれる澱粉成分の含量を任意に変化させることができとなり、米の食味性および収量の著しい向上を可能にするものである。

【0083】また、本発明により得られたイネ澱粉枝つけ酵素遺伝子のプロモーターを用いることにより、イネ澱粉枝つけ酵素遺伝子あるいは外来遺伝子を、種子で特異的に発現させることができとなる。

【0084】

【配列表】

配列番号：1

配列の長さ：2918

配列の形：核酸

鎖の数：2本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：cDNA to mRNA

起源：

50 生物名：オリザ サティバ (*Oryza sativa*)

15

組織の種類：登熟期種子  
 直接の起源  
 ライブライナー名：イネ登熟期種子cDNAライブラリー  
 クローン名：pRB33  
 配列の特徴  
 特徴を示す記号：5' UTR  
 存在位置：1..127  
 特徴を決定した方法：P  
 特徴を示す記号：mRNA  
 存在位置：1..2918

16

特徴を決定した方法：P  
 特徴を示す記号：transit peptide  
 存在位置：128..322  
 特徴を決定した方法：S  
 特徴を示す記号：mature peptide  
 存在位置：323..2602  
 特徴を決定した方法：E  
 特徴を示す記号：3' UTR  
 存在位置：2603..2918  
 10 特徴を決定した方法：P

## 配列

CGGGCACAC CCACACACCG ACCACCAGGC AGCGCTCCT CGCTTGGCT CTCGCGTGAG	60
GAGGGTTAG GTGAAGCAG AGCGCGGGGG TTCCCGGGGG ATCCGATCCG GCTGCCGTGC	120
GGCCGAG ATG GCG GCG CCG TCT GCG GTT CCC GGG AGC GCG GCG GGG	169
Met Ala Ala Pro Ala Ser Ala Val Pro Gly Ser Ala Ala Gly	
5 10	
CTA CGG GCC GGG GCC GTG CGG TTC CCC GTG CCA GCC GGG GCC CGG AGC	217
Leu Arg Ala Gly Ala Val Arg Phe Pro Val Pro Ala Gly Ala Arg Ser	
15 20 25 30	
TGG CGT CGG GCG GCG GAG CTC CCGACG TCG CGG TCG CTG CTC TCC GCC	265
Trp Arg Ala Ala Ala Glu Leu ProThr Ser Arg Ser Leu Leu Ser Gly	
35 40 45	
CGG AGA TTC CCC GGT GCC GTT CGCGTG GGG GGT TCC CGG GGG CCC GTG	313
Arg Arg Phe Pro Gly Ala Val ArgVal Gly Gly Ser Gly Gly Arg Val	
50 55 60	
GCC GTG CGC CGC GCG GCG TCA GGG GAG GTG ATG ATC CCC GAG GGC	361
Ala Val Arg Ala Ala Gly Ala Ser Gly Glu Val Met Ile Pro Glu Gly	
65 70 75	
GAG AGC GAC GGG ATG CCG GTT TCA GCA GGT TCA GAC GAT CTG CAG TTG	409
Glu Ser Asp Gly Met Pro Val Ser Ala Gly Ser Asp Asp Leu Gln Leu	
80 85 90	
CCA GCC TTA GAT GAT GAA TTA ACC ACG GAG GTT GGA GCT GAA GTT GAG	457
Pro Ala Leu Asp Asp Glu Leu Ser Thr Glu Val Gly Ala Glu Val Glu	
95 100 105 110	
ATT GAG TCA TCT GGA GCA AGT GAC GTT GAA GGC GTG AAG AGA GTG GTT	505
Ile Glu Ser Ser Gly Ala Ser Asp Val Glu Gly Val Lys Arg Val Val	
115 120 125	
GAA GAA TTA GCT GCT GAG CAG AAA CCA CGA GTT GTC CCA CCA ACA GGA	553
Glu Glu Leu Ala Ala Glu Gln Lys Pro Arg Val Val Pro Pro Thr Gly	
130 135 140	
GAT GGG CAA AAA ATA TTC CAG ATG GAC TCT ATG CTT AAT GGC TAT AAG	601
Asp Gly Gln Lys Ile Phe Gln Met Asp Ser Met Leu Asn Gly Tyr Lys	
145 150 155	
TAC CAT CTT GAA TAT CGA TAT AGC CTA TAT AGG AGA CTG CGT TCA GAC	649
Tyr His Leu Glu Tyr Arg Tyr Ser Leu Tyr Arg Arg Leu Arg Ser Asp	
160 165 170	
ATT GAT CAG TAT GAA GGA GGA CTG GAA ACA TTT TCT CGC GGT TAT GAG	697
Ile Asp Gln Tyr Glu Gly Leu Glu Thr Phe Ser Arg Gly Tyr Glu	
175 180 185 190	
AAG TTT GGA TTT AAT CAC AGT GCT GAA GGT GTC ACT TAT CGA GAA TGG	745

17

18

Lys Phe Gly Phe Asn His Ser Ala Glu Gly Val Thr Tyr Arg Glu Trp		
195	200	205
GCT CCC GGG GCA CAT TCT GCA GCA TTA GTA GGT GAC TTC AAC AAT TGG		793
Ala Pro Gly Ala His Ser Ala Ala Leu Val Gly Asp Phe Asn Asn Trp		
210	215	220
AAT CCA AAT GCA GAC CGC ATG AGC AAA AAT GAG TTT GGT GTT TGG GAG		841
Asn Pro Asn Ala Asp Arg Met Ser Lys Asn Glu Phe Gly Val Trp Glu		
225	230	235
ATT TTT CTG CCT AAC AAT GCT GAT GGC TCA TCT CCT ATT CCA CAT GGC		889
Ile Phe Leu Pro Asn Asn Ala Asp Gly Ser Ser Pro Ile Pro His Gly		
240	245	250
TCA CGT GTA AAG GTG CGA ATG GAA ACT CCA TCT GGT ATA AAG GAT TCT		937
Ser Arg Val Lys Val Arg Met Glu Thr Pro Ser Gly Ile Lys Asp Ser		
255	260	265
ATT CCT GCC TGG ATC AAG TAC TCT GTG CAG GCC GCA GGA GAA ATC CCA		985
Ile Pro Ala Trp Ile Lys Tyr Ser Val Glu Ala Ala Gly Glu Ile Pro		
275	280	285
TAC AAT GGA ATA TAT TAT GAT CCT CCT GAA GAG GAG AAG TAC ATA TTC		1033
Tyr Asn Gly Ile Tyr Tyr Asp Pro Pro Glu Glu Glu Lys Tyr Ile Phe		
290	295	300
AAG CAT CCT CAA CCT AAA AGA CCA AAG TCA TTG CGG ATA TAC GAA ACT		1081
Lys His Pro Gln Pro Lys Arg Pro Lys Ser Leu Arg Ile Tyr Glu Thr		
305	310	315
CAT GTT GGA ATG AGT AGC ACG GAG CCA AAG ATC AAC ACG TAT GCA AAC		1129
His Val Gly Met Ser Ser Thr Glu Pro Lys Ile Asn Thr Tyr Ala Asn		
320	325	330
TTT AGG GAT GAG GTG CTT CCA AGA ATC AAA AAG CTT GGA TAC AAT GCA		1177
Phe Arg Asp Glu Val Leu Pro Arg Ile Lys Lys Leu Gly Tyr Asn Ala		
335	340	345
GTG CAA ATA ATG GCA ATT CAA GAG CAT GCA TAT TAT GGA AGC TTT GGG		1225
Val Gln Ile Met Ala Ile Gln Glu His Ala Tyr Tyr Gly Ser Phe Gly		
355	360	365
TAC CAT GTC ACC AAT TTC TTT GCA CCA AGT AGT CGT TTC GGG ACC CCA		1273
Tyr His Val Thr Asn Phe Phe Ala Pro Ser Ser Arg Phe Gly Thr Pro		
370	375	380
GAA GAT TTA AAG TCA TTG ATT GAT AAA GCT CAT GAG CTT GGT TTA GTT		1321
Glu Asp Leu Lys Ser Leu Ile Asp Lys Ala His Glu Leu Gly Leu Val		
385	390	395
GTG CTC ATG GAT GTT GTT CAC AGC CAT GCG TCA AAT AAT ACC CTA GAT		1369
Val Leu Met Asp Val Val His Ser His Ala Ser Asn Asn Thr Leu Asp		
400	405	410
GGG TTG AAC GGT TTT GAT GGT ACA GAT ACG CAT TAC TTT CAT AGT GGT		1417
Gly Leu Asn Gly Phe Asp Gly Thr Asp Thr His Tyr Phe His Ser Gly		
415	420	425
TCA CGC GGC CAT CAT TGG ATG TGG GAT TCT CGC CTT TTC AAC TAT GGG		1465
Ser Arg Gly His His Trp Met Trp Asp Ser Arg Leu Phe Asn Tyr Gly		
435	440	445
AAT TGG GAA GTT CTA AGA TTT CTA CTA TCC AAT GCA AGA TGG TGG CTC		1513
Asn Trp Glu Val Leu Arg Phe Leu Leu Ser Asn Ala Arg Trp Trp Leu		
450	455	460

19

20

GAG GAG TAT AAG TTT GAT GGT TTC AGA TTT GAC GGT GTA ACC TCA ATG Glu Glu Tyr Lys Phe Asp Gly Phe Arg Phe Asp Gly Val Thr Ser Met 465 470 475	1561
ATG TAC ACT CAT CAT GGA TTA CAA GTA GCA TTT ACG CGG AAC TAC AGT Met Tyr Thr His His Gly Leu Gln Val Ala Phe Thr Gly Asn Tyr Ser 480 485 490	1609
GAA TAC TTT GGA TTT GCC ACT GAT GCT GAT GCA GTA GTT TAC TTG ATG Glu Tyr Phe Gly Phe Ala Thr Asp Ala Asp Ala Val Val Tyr Leu Met 495 500 505 510	1657
CTG GTA AAT GAT TTA ATT CAT GGA CTT TAT CCT GAG GCC ATA ACC ATC Leu Val Asn Asp Leu Ile His Gly Leu Tyr Pro Glu Ala Ile Thr Ile 515 520 525	1705
GGT GAA GAT GTC AGT GGA ATG CCT ACA TTT GCC CTT CCT GTT CAA GAT Gly Glu Asp Val Ser Gly Met Pro Thr Phe Ala Leu Pro Val Gln Asp 530 535 540	1753
GGT GGG GTT CGT TTT GAT TAT CGC CTT CAT ATG GCT GTT CCT GAC AAA Gly Gly Val Gly Phe Asp Tyr Arg Leu His Met Ala Val Pro Asp Lys 545 550 555	1801
TGG ATT GAA CTC CTC AAG CAA AGT GAT GAA TCT TGG AAG ATG GGT GAT Trp Ile Glu Leu Leu Lys Gln Ser Asp Glu Ser Trp Lys Met Gly Asp 560 565 570	1849
ATT GTG CAC ACA CTG ACT AAC AGA AGG TGG TCA GAG AAG TGT GTT ACT Ile Val His Thr Leu Thr Asn Arg Arg Trp Ser Glu Lys Cys Val Thr 575 580 585 590	1897
TAT GCT GAA AGT CAT GAT CAA GCA CTA GTT GGT GAC AAA ACT ATT GCA Tyr Ala Glu Ser His Asp Gln Ala Leu Val Gly Asp Lys Thr Ile Ala 595 600 605	1945
TTC TGG TTG ATG GAC AAG GAT ATG TAT GAT TTT ATG GCT CTG GAC AGA Phe Trp Leu Met Asp Lys Asp Met Tyr Asp Phe Met Ala Leu Asp Arg 610 615 620	1993
CCG GCA ACA CCT AGC ATT GAT CGT GGA ATA GCA TTG CAT AAA ATG ATT Pro Ala Thr Pro Ser Ile Asp Arg Gly Ile Ala Leu His Lys Met Ile 625 630 635	2041
AGA CTT ATC ACA ATG GGG TTA GGA GGA GAA GGC TAT CTT AAC TTT ATG Arg Leu Ile Thr Met Gly Leu Gly Glu Gly Tyr Leu Asn Phe Met 640 645 650	2089
GGA AAT GAG TTC GGA CAT CCT GAA TGG ATT GAT TTT CCA AGA GCT CCA Gly Asn Glu Phe Gly His Pro Glu Trp Ile Asp Phe Pro Arg Ala Pro 655 660 665 670	2137
CAA GTA CTT CCA AAT GGT AAA TTC ATC CCA GGG AAT AAC AAC AGT TAT Gln Val Leu Pro Asn Gly Lys Phe Ile Pro Gly Asn Asn Asn Ser Tyr 675 680 685	2185
GAT AAA TGC CGT CGA AGA TTT GAC CTG GGT GAT GCG GAC TAT CTT AGG Asp Lys Cys Arg Arg Phe Asp Leu Gly Asp Ala Asp Tyr Leu Arg 690 695 700	2233
TAT CGT GCC ATG CTA GAG TTT GAC CGC GCG ATG CAG TCT CTC GAG GAA Tyr Arg Gly Met Leu Glu Phe Asp Arg Ala Met Gln Ser Leu Glu Glu 705 710 715	2281
AAA TAT GGG TTC ATG ACA TCA GAC CAC CAG TAC ATA TCT CGA AAG CAT Lys Tyr Gly Phe Met Thr Ser Asp His Gln Tyr Ile Ser Arg Lys His	2329

21

22

720	725	730	2377
GAA GAG GAT AAG ATG ATT ATA TTT GAG AAG GGA GAT CTG GTA TTT GTG			
Glu Glu Asp Lys Met Ile Ile Phe Glu Lys Gly Asp Leu Val Phe Val			
735	740	745	750
TTC AAC TTC CAT TGG AGT AAC AGC TAT TTT GAC TAC CGT GTT GGT TGT			2425
Phe Asn Phe His Trp Ser Asn Ser Tyr Phe Asp Tyr Arg Val Gly Cys			
755	760	765	
TTA AAG CCA GGG AAA TAT AAG GTG GTC TTG GAC TCA GAT GCT GGA CTC			2473
Leu Lys Pro Gly Lys Tyr Lys Val Val Leu Asp Ser Asp Ala Gly Leu			
770	775	780	
TTT GGT GGA TTT GCC AGG ATC CAT CAC ACT GCA GAG CAC TTC ACT GCC			2521
Phe Gly Gly Phe Gly Arg Ile His His Thr Ala Glu His Phe Thr Ala			
785	790	795	
GAT TGT TCA CAT GAC AAC AGG CCC TAC TCG TTC TCA GTT TAT TCT CCT			2569
Asp Cys Ser His Asp Asn Arg Pro Tyr Ser Phe Ser Val Tyr Ser Pro			
800	805	810	
AGC AGA ACC TGC GTT GTC TAT GCT CCA GCG GAA TGAGAACACC AAGAGGCCAGC			2622
Ser Arg Thr Cys Val Val Tyr Ala Pro Ala Glu			
815	820	825	
ATGCAAGTGT GTGCGGCTGG CTAGTGGCAA GGAGCAAGAA AACTAGTTG CCAGCAATCT			2682
GTGAACGGCT TTCCCTAGGT CTGCTTCGAT GAATGCCGG TAGACTAGAC AGCTTGCTTT			2742
TGTGCTTITGC GCTCCCAATT TGTAGTTTTA GTTTGTGAGG GAAAGAAACG TTTATTGTA			2802
ATTATCTATG GCTGTCGAAC GCGCACAAA CCATGAACCC CGTATATTG TTGGTACCGT			2862
TCGAACTGCC AGTTATACAT AGTTCTGCAC TTCTGTACAT CTTGTGATGC TTGAATC			2919

【0085】配列番号：2

\* 配列の種類：起源：

配列の長さ：20

生物名：オリザ サティバ (*Oryza sativa*)

配列の形：アミノ酸

組織の種類：登熟期種子

トポロジー：直鎖状

\*

配列

Ala Ala Gly Ala Ser Gly Glu Val Met Ile Pro Glu Gly Glu Xaa Asp

5

10

15

Gly Met Pro Val

20

【0086】配列番号：3

生物名：オリザ サティバ (*Oryza sativa*)

配列の長さ：38

組織の種類：登熟期種子

配列の形：核酸

直接の起源

鎖の数：1本鎖

クローニング名：pRBP1

トポロジー：直鎖状

配列の特徴

配列の種類：他の核酸 合成DNA

特徴を示す記号：promoter

配列

40 存在位置：1..996

ACNGGCATNC CRTCRCAYTC NCCYTCNGGN ATCATNAC 38

特徴を決定した方法：P

【0087】配列番号：4

特徴を示す記号：TATA signal

配列の長さ：1110

存在位置：953..958

配列の形：核酸

特徴を決定した方法：S

鎖の数：2本鎖

特徴を示す記号：mRNA

トポロジー：直鎖状

存在位置：997..1110

配列の種類：Genomic DNA

特徴を決定した方法：S

起源：

配列

GAATTCTAA GTACTCAACT CACACGTTG GTGTGCTTGG TTTCATGGGC TGGCCCAACA

60

23

24

GAAAAATCGC	TCTGCCAAT	CCGCTGACG	CACGGGAGT	GCCCCACTCG	CTAGAGGTG	120
TGCTCCATT	TGGCAGCCCA	TTGTTCACCG	CGAGAAAGGA	TGATGGACCA	CAGGCTACTA	180
GGCTAGTCAG	GTCACGCTTC	GCACGAGTGC	TTCTCCCTCA	CGTGCTCCTC	AACGTTTACA	240
CAGAGGTGAC	AGAGCAGAAC	AGAAAATGA	AACAACAGAG	CACCGGTGTT	GCCTTCTTCC	300
ATTCACGTGAG	AAITTTGTTTC	GTGTAAGCCT	CCTGGGTCCA	GCCCAACTCC	CATCTCCCT	360
TTTGTGTTT	TCCCTGGGTA	ACAAAAAGCG	CGACCAAAGA	GGACAAGGAA	AAACAAAAG	420
AAGCACAGGA	GTAGCAAGTA	GCAGGGAGGG	AGACGGACG	CAAGCGGCAT	TACGGGTGGA	480
GAGGGAAAGC	CTCCCCGGCG	TTGGTTTCT	TTTCTCTCC	TCTTCCTCCC	CAACCCGCGC	540
CGTGCCGCAC	GCCGCGCCAC	GCCAATCGA	TCGGTGGTGA	CTCCGCGCTGC	CTCCACCCGC	600
GGCCGACGCC	CGCTGCCCTC	CACCTCCAC	CTGGCAGCAG	CGGCTGGCAT	GGCAGTGGAG	660
ACGGCCGCT	CCTCTCTCT	CCCTTCCCCC	GGCTAACGCA	AACGTGACGC	CGGGCGCGC	720
ACGGGAAAGC	GGACGCTTTC	ATCGCGAGGG	GGGAGGGAA	AAGCCTCGCC	CTCCGCCCTC	780
GCCGCCCTGAC	TCCGTGCC	GCGGATTGGA	CCGACGCGCA	ACCGCCCTTT	CGGCCCCGT	840
CCCCCCAGTG	CACCGATCGC	ACACCCACCC	TCGGCGGCCT	CGATGCCACT	CTCGCGTGAG	900
GGGTTGCTC	CATCAGGACC	AGAGCTCTC	CTCTCGTCC	TCTATATAGC	GGGGCGCCCT	960
CCGCTCTCC	TAGCTTCAGC	ACCACTGAC	CCGCACCCGC	GCACACCCAC	ACACCGACCA	1020
CCAGGCAGGG	CCTCCTCCCT	TTGGCTCTCG	CGTGAGGAGG	GTTTAGGTGG	AAGCAGAGCG	1080
CGGGGGTTGC	CGGGGGATCC					1100

【0088】配列番号：5

配列の長さ：20

配列の形：核酸

鎖の数：1本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：他の核酸 合成DNA

配列

TTCTTAAGTA CTCAACTCAC 20

【0089】配列番号：6

20 配列の長さ：21

配列の形：核酸

鎖の数：1本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：他の核酸 合成DNA

配列

GGTGTGTGGG TGTGCGCCGT 21

フロントページの続き

(51) Int.Cl.<sup>5</sup>

識別記号

府内整理番号

F I

技術表示箇所

C 1 2 P 19/16

7432-4B

// A 2 3 L 1/10

Z

C 1 2 N 9/10

9359-4B

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning  
Operations and is not part of the Official Record**

## **BEST AVAILABLE IMAGES**

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- BLACK BORDERS**
- IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES**
- FADED TEXT OR DRAWING**
- BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING**
- SKEWED/SLANTED IMAGES**
- COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS**
- GRAY SCALE DOCUMENTS**
- LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT**
- REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY**
- OTHER:** \_\_\_\_\_

**IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.**

**As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.**